

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003651

International filing date: 03 March 2005 (03.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-309702
Filing date: 25 October 2004 (25.10.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

08. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 1 0 月 2 5 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 3 0 9 7 0 2

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

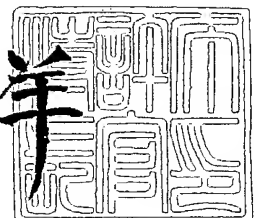
J P 2 0 0 4 - 3 0 9 7 0 2

出 願 人
Applicant(s): 株式会社三菱化学ビーシーエル

2 0 0 5 年 4 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 4-1153
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 30/02
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都板橋区志村三丁目 3 0 番 1 号 株式会社 三菱化学ビーシーエル内
 【氏名】 関根恭一
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都板橋区志村三丁目 3 0 番 1 号 株式会社 三菱化学ビーシーエル内
 【氏名】 植竹達雄
【特許出願人】
 【識別番号】 591122956
 【氏名又は名称】 株式会社三菱化学ビーシーエル
【代理人】
 【識別番号】 100088904
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 庄司 隆
 【電話番号】 03-3864-6572
【選任した代理人】
 【識別番号】 100124453
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 資延 由利子
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004- 59834
 【出願日】 平成16年 3月 3日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 067070
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析することを特徴とする、摂取された健康補助食品、薬剤または食物に含まれる脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の程度を判定する方法。

【請求項 2】

唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを指標として分析することを特徴とする、摂取された薬剤の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用を判定する方法。

【請求項 3】

唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを指標として分析することを特徴とする、病態の検査方法。

【請求項 4】

唾液が、耳下腺唾液である、請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

耳下腺唾液が、耳下腺唾液を選択的かつ定量的に採取する唾液採取具で採取されたものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

唾液採取具が、(a) 唾液を不可逆的に吸収する吸収体からなる採取部と、(b) 吸収体に採取された唾液の量を定量する定量部、を有することを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

唾液採取具が、さらに唾液の保存料溶液を含み唾液を吸収した吸収体を該溶液に浸漬して保存する保管容器部を有することを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

唾液の保存料溶液が、水溶性の有機溶媒であることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

(a) 採取された唾液、該唾液を吸収した吸収体及び／又は該吸収体を保存した保存料溶液を、水溶性の有機溶媒で抽出する工程、
(b) 抽出液を分析試料とし、高速液体クロマトグラフィーにより脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分離する工程、
(c) 分離した脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを検出する工程、を含むことを特徴とする、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターが、CoQ10、リコペン、β-カロテンおよびトコフェロールからなる群から選ばれる少なくとも一つの物質である、請求項 1～9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1～10 のいずれかに記載の方法を使用する薬剤または健康補助食品のスクリーニング方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】唾液分析による脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の程度の判定方法

【技術分野】

【0001】

この発明は、唾液分析による脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の程度の判定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ダイエタリー・サプリメント (Dietary Supplement) は、「健康補助食品」とか「栄養補助食品」と訳され、主に、ビタミンやミネラル、アミノ酸など、日ごろ不足がちな栄養成分を補助する目的で摂取される（以下、「サプリメント」、「健康補助食品」または「栄養補助食品」と称することがある）。米国にはサプリメントについての法律があり、サプリメントを食品とも医薬品とも異なる新しいジャンルとして位置づけ、病気の発症リスクを下げる働きなどについての健康強調表示 (Health Claim) を許可し、使用されている。

通常、生体投与された物質の生体内移行の分析は、血中内含有量、或は尿内含有量などの分析によっておこなわれるが、医療機関等の特定の施設による検体採取が必須であり、栄養補助食品等に含まれる栄養成分の生体内移行の分析には不適である。

また、唾液も検体の一つになりうるが、健康補助食品の摂取における、健康補助食品に含まれる栄養成分の生体内移行の分析方法の検体としては不適であった。これは、検体採取の方法が確立しておらず、反復性ある数値の取得が困難なことも理由の一つであった。

健康補助食品に含まれる栄養成分の一つであるCoQ10は、ミトコンドリアに常在し、電子伝達系で還元型のユビデカレノール (CoQ10H₂) から酸化型のユビデカレノン (CoQ10) への酸化によりADPをATPへ変換させるエネルギー生産に関わる有名な補酵素である。その体内での主な存在部位は血中ではなく組織であり、細胞膜および細胞内器官のリン脂質二重膜に還元型としてCoQ10の約9割が存在する。CoQ10は体内でコレステロール合成経路と共通の律速酵素反応を経て合成されるためビタミンではないが、スタチン系薬剤投与患者では合成が阻害されると言われている。脂溶性の高いスタチン系薬剤ほどこの合成阻害の程度が強いと言われ、CoQ10の摂取がこれによる副作用回避に有用と考えられており米国で一昨年より併用投与による治験が行われている。

健康補助食品に含まれる栄養成分の一つであるビタミンEは、脂質のラジカルによる酸化防御物質の主役であり、ビタミンEラジカル同士の衝突によりラジカルは消去される。存在量の多いビタミンEではラジカル同士の衝突確立が低く、かえってラジカルの残存時間を長引かせてしまう。しかし体内では還元型CoQ10がトコフェロールラジカルのラジカル消去を強く関係すると考えられている。

一方、先進国では動脈硬化に起因すると考えられる心筋梗塞や脳梗塞による死亡率上昇と、生活習慣に起因すると考えられる糖尿病患者が増加しており、国内では糖尿病が新たな血液透析患者となる病因の第一となっている。

これらいわゆる生活習慣病は、食生活の影響を強く受け、体内酸化ストレスの増加が生活習慣病発症に強くかかわっていると考えられており、栄養補助食品として抗酸化ストレス物質の積極的摂取が推奨されている。しかし、いわゆる非病者では病院で治療をうけるほどではないため、医師による健康管理を受ける機会を逃し、病態を進展させてから受診する悪循環が、患者増加の一因となっていると考えられる。

これまで唾液および唾液分泌にかかわる唾液分泌腺におけるCoQ10濃度および含量に関する報告はなかった。これは、人体内で合成不可能なビタミンおよび食事により摂取可能ないわゆるサプリメントの唾液中の濃度測定値は、口腔内に残留する飲食物の量および種類の影響とともに、高密度に存在する多様な細菌や真菌由来物の影響、さらには歯表面のプラーク菌叢の影響も受けると容易に想定されるためと考えられる。

しかし、全唾液、耳下腺唾液、顎下腺唾液および舌下腺唾液中の全てについてトコフェロ

ール、リコペンおよびCoQ10等の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターは分析できていなかった。また、脂溶性の一つのビタミンAのプロビタミンであるβ-カロテンについても、血清と全唾液中濃度の間に正相関を示すことが知られていただけでだけである（例えば、非特許文献1、2参照）。非特許文献1の報告者らの目的は、「摂取したβ-カロテンが唾液腺でのグリコプロテインやリゾチーム等の抗細菌タンパク質の生産分泌を増強し、口腔衛生維持に役立つとの想定を確認検証すること」、即ちβ-カロテンの新規な生理作用の発見であった。非特許文献1の報告者らの目的とした生理活性は、同文献にて認めることができない結果であったと結論されたため、本来の目的ではない全唾液中β-カロテンを分析することは産業上意味のないことと考えられていた。さらに耳下腺唾液中のβ-カロテンを検出することすらできないままに残されていたため、耳下腺唾液も相当量混入する全唾液中のβ-カロテンを分析して生体内への移行の程度を簡便に判定する方法は、適切な方法ではないと考えられていた。したがって、これまで検出不可能とされてきた耳下腺唾液中にβ-カロテンを検出し、また、全唾液よりもむしろ耳下腺唾液こそ、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析して、これらの生体内移行の程度を判定するのに適した生体試料であることを新たに提示する意義は大きい。さらに、唾液、特に耳下腺唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析して、これらの生体内移行の程度を判定する方法を提供することは大きな意義がある。

【非特許文献1】Int. J. Vitam. Nutr. Res. 1988;58(2): 171-7 Saliva concentrations of some selected proteins and glycoprotein markers in man after supplementary intake of beta-carotene. Lumikari M, Johansson I, Ericson T, Virtamo J.

【非特許文献2】Nutr. Cancer 1988; 11(4): 233-41 Effects of excess vitamin A and canthaxanthin on salivary gland tumors. Alam BS, Alam SQ, Weir JC Jr.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の課題は、健康補助食品、薬剤または食物（以下、「健康補助食品等」と称することがある）の摂取における、健康補助食品等に含まれる栄養成分である脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の程度の判定方法に関する簡易な手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

上記課題を解決するために本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、健康補助食品等の摂取における健康補助食品等に含まれる栄養成分である脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の程度の判定のためには、検体を選択することにより解決出来ることを見出した。特に唾液中の分析対象物の濃度レベルが血中の約1/10程度で、確実にフォローできることを見出した。すなわち、本発明者らは、全唾液中だけでなく、検出不能であった耳下腺唾液中にβ-カロテンだけでなくリコペン、トコフェロールおよびCoQ10を検出し分析可能であることを見出した。また、全唾液中CoQ10等の濃度は血中濃度と相関せず、耳下腺唾液が血中濃度と正相関することを見出し、耳下腺唾液採取方法を鋭意検討改良した。さらに本発明者らは、唾液を吸収させた吸収体をエタノールで抽出すれば吸収体の素材によらず脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターをほぼ100%回収できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

【0005】

すなわち本発明は、

1. 唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析することを特徴とする、摂取された健康補助食品、薬剤または食物に含まれる脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の程度を判定する方法。
2. 唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを指標として分析することを特徴とする、摂取された薬剤の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの

生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用を判定する方法。

3. 唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを指標として分析することを特徴とする、病態の検査方法。

4. 唾液が、耳下腺唾液である、前項1～3のいずれかに記載の方法。

5. 耳下腺唾液が、耳下腺唾液を選択的かつ定量的に採取する唾液採取具で採取されたものである、前項4に記載の方法。

6. 唾液採取具が、(a) 唾液を不可逆的に吸収する吸収体からなる採取部と、(b) 吸収体に採取された唾液の量を定量する定量部、を有することを特徴とする、前項5に記載の方法。

7. 唾液採取具が、さらに唾液の保存料溶液を含み唾液を吸収した吸収体を該溶液に浸漬して保存する保管容器部を有することを特徴とする、前項6に記載の方法。

8. 唾液の保存料溶液が、水溶性の有機溶媒であることを特徴とする、前項7に記載の方法。

9. (a) 採取された唾液、該唾液を吸収した吸収体及び／又は該吸収体を保存した保存料溶液を、水溶性の有機溶媒で抽出する工程、

(b) 抽出液を分析試料とし、高速液体クロマトグラフィーにより脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分離する工程、

(c) 分離した脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを検出する工程、を含むことを特徴とする、前項1～8のいずれかに記載の方法。

10. 脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターが、CoQ10、リコペン、 β -カロテンおよびトコフェロールからなる群から選ばれる少なくとも一つの物質である、前項1～9のいずれかに記載の方法。

11. 前項1～10のいずれかに記載の方法を使用する薬剤または健康補助食品のスクリーニング方法。」

からなる。

【発明の効果】

【0006】

本発明で提供された方法は、健康補助食品等の摂取において、健康補助食品等に含まれる栄養成分である脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の程度を簡易に判定可能であり、唾液から脂溶性ビタミン（トコフェロール等）、抗酸化物質のリコペン、 β -カロテン、CoQ10等の分析が可能である。本発明の方法によると、薬剤もしくは健康補助食品の摂取量に応じて、唾液中の目的とする脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの増加を確認できた。これにより、食事等の栄養価評価、薬剤もしくは健康補助食品の摂取による脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行度の程度の判定が唾液によって非侵襲的に可能となり、また、摂取された薬剤の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用の判定が唾液によって非侵襲的に可能となり、本発明は、病態把握、薬剤もしくは健康補助食品開発等に利用可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

以下に記載する詳細な説明は、本発明の実施態様の一例（代表例）であり、これらの内容に特定はされない。

本発明の本質は、唾液という非侵襲的に採取可能な検体が、健康補助等の摂取において、健康補助食品等に含まれる栄養成分の生体内移行の程度を判定するために有用であるということを見出したことにある。なお、本発明では、測定値を求める行為および測定値を求める方法を分析法と称し、個々の試料および複数試料の分析により得られた値を測定値と称し、対照の測定値を比較検討して生体内の移行の程度を判断することを判定と称する。また、本発明で対象とする健康補助食品等に含まれる栄養成分とは、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクター等である。具体的には脂溶性ビタミンとしてはビタミンE

であるトコフェロールやビタミンAのプロビタミンである β -カロテン等が、脂溶性フードファクターとしては生体内合成可能なCoQ10やビタミンではないため摂取を必須としないが積極的な摂取による健康維持増進効果を期待される抗酸化物質のリコペン等が例示される。

検体は、唾液であり、特に好ましくは耳下腺唾液である。この耳下腺唾液をより選択された環境下で採取することによって、より正確な数値をえることができる。唾液は、その約70%程が舌下腺及び顎下腺から分泌され、残りの約20%程度が耳下腺より分泌される。この耳下腺唾液をより選択的に採取することにより、本発明の目的は達成できる。この採取のためには、既に市販の唾液採取具（例えば、Saliva-sampler ((Saliva Diagnostic Systems Inc.)、Orasure(Orasure Technologies, Inc.、特表平5-506925号)、Salivet (アシスト社))を使うことが可能であるが、その形態は少なくとも、耳下腺部について、より選択的に接触可能なものがよい。例えば、採取部が扁平であれば、唾液採取により好適である。耳下腺唾液採取には、例えば歯列と頬内側に吸収体を挟んで行う。唾液採取量は、採取具の吸収体の種類により変更されるが、相対的な数値を得るためには、特定の吸収体を使い、吸収体に脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターが吸着するため、一定量の吸収体に対し一定量の唾液と接触させることが必須である。即ち、採取者による吸収体と唾液接触量の比率が一定に保つように配慮され、かつ溶媒を添加して分析試料を液体として回収できる吸収体使用量とすることが必要である。具体的には、唾液を不可逆的に吸収する吸収体を用いるのが好ましく、例えば、毛細管現象を利用した吸収体が挙げられる。

また、採取具は、採取量の一定化を図るために採取インジケータのような機能を付加してもよい。これは例えば採取された唾液量が毛細管現象等で確認できる手段を意味する。吸収体としては、吸水性がありエタノールのようなアルコール類に溶解しないものであればポリエステル繊維や発砲ウレタンのような人工高分子素材および脱脂綿・紙・パルプのような天然素材のいずれも利用できるが、綿素材が最適である。また、採取具に、唾液を吸収させた吸収体を保存する保管容器部を付加してもよく、さらにこの保管容器部は該吸収体を浸漬して保存するために唾液の保存料溶液を含んでいてもよい。保存料溶液は、水溶性の有機溶媒であればいずれでもよい。例えば、エタノール、メタノールまたはイソプロパノールなどの低級アルコール類が挙げられる。被験者から唾液を採取した採取具を分析機関が郵送で回収する場合は、郵便法等の規定で可燃物に該当しない濃度のエタノールが望ましい。

また、採取具も郵送が可能なものであればいずれでもよいが、定形郵便として郵送できる形状のものが望ましい。

また、唾液分泌の生理的影響の少ない耳下腺唾液試料を採取するため、唾液採取の時期は、唾液分泌が盛んに行われた食後すぐよりも唾液分泌状態の安定している食間が好ましく、特に食後2時間以上経ってから採取することが望ましい。

【0008】

採取された唾液は、採取具のまま保管容器に保存され、例えば分析機関等に回収され分析に付される。目的物質である脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターの分析は、採取具から脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターを抽出分離して定量すればよいが、具体的には、(a) 採取された唾液、該唾液を吸収した吸収体及び/又は該吸収体を保存した保存料溶液を溶媒で処理して脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターを抽出する工程、(b) 抽出液から例えば高速液体クロマトグラフィーにより脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターを分離する工程、(c) 分離した脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターを例えばUV検出器や電気化学検出器 (ECD) 等の微量検定に適した公知の分析法で定量する工程、を含む方法を挙げることができる。

抽出に用いる溶媒は、採取された唾液、該唾液を吸収した吸収体及び/又は該吸収体を保存した保存料溶液から、タンパク質を除去しながら、目的の脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターを抽出できるものが好ましく、上記の水溶性溶媒がより好ましく、特に抽出に好ましい濃度の水溶性溶媒、具体的には少なくとも75%の最終濃度を与え

るエタノールが最適の溶媒である。その他、溶媒としては、UV検出器よりも高感度なECD検出器に利用可能であるメタノールおよびイソプロパノール等も使用できる。

例えば抽出方法は、具体的には、唾液1mlを吸収した吸収体に対して、溶媒としてエタノールでは3倍体積量以上（約66%以上）を添加し、接触させる。イソプロパノールおよびメタノールでは唾液に対して5倍液量以上を接触させることが必要である。吸収体から溶解は直ちに起き、また長時間経過後再吸着することはない。唾液1mlに対する脱脂綿使用量は約250mgが好適である。抽出された検体は、そのまま或は遠心分離して凝集したタンパクを除去した上清を回収するような前処理を施し、分析に供させる。

【0009】

このようにして得られた数値は、摂取された脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内の移動状態を示しており、この数値を例えば摂取前の数値等と比較することにより、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の程度を判定することができ、すなわち被験者の健康状態、被験者の吸収力或は栄養化力等を判定可能であり、被験者の病態検査の方法を提供する。

さらに、このような分析方法は、摂取された脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の追跡を可能とし、創薬もしくは新規な健康補助食品のスクリーニング方法として使用可能である。

【実施例】

【0010】

以下実施例をあげて本発明を説明する。以下の実施例では、健康補助食品等に含まれる栄養成分の代表例として、CoQ10及びトコフェロールを使って効果の確認をおこなったが、本発明は、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターに適用可能であり、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。なお、実施例で、検体中のCoQ10、トコフェロール、リコペン、 β -カロテンは次のように分析した。

【0011】

(分析条件)

HPLCは血漿中CoQ10分析法である既知の方法 (Analytical Biochemistry Vol.250, p66-73, 1997) を参考とし、唾液分析に適するように改良を加えて実施した。

【0012】

前処理およびオートサンプラーへの搭載

試料の前処理は、オートサンプラーバイアル(サンプラーバイアル P P 250 μ l : 資生堂製)に血漿20 μ lとエタノール (和光純薬 : HPLCグレード) 180 μ lを加えエタノール終濃度90% (V/V)とし、5分間1000 Gにて冷却遠心分離によりタンパクを沈殿させて行った。直接採取した唾液では、試料50 μ lにエタノール150 μ lを加え、エタノール終濃度75% (V/V)とし、5分間1000 Gにて冷却遠心分離によりタンパクを沈殿させて行った。Saliva-sampler (Saliva Diagnostic Systems Inc. 製)を用いて採取した耳下腺唾液の場合は、唾液液量として1ml吸着されるので、これに3mlのエタノール (HPLCグレード) を加え15分間の転倒混和した後、200 μ lをオートサンプラーバイアル(サンプラーバイアル P P 250 μ l : 資生堂製)に分取し、5分間1000 Gにて冷却遠心分離によりタンパクを沈殿させて行った。遠心分離されたオートサンプラーバイアルは、オートサンプラーに搭載し高速クロマトグラフィー (HPLC) に供した。

【0013】

(使用カラム)

HPLCには以下の3種類のカラムを用意した。

1. 濃縮カラム : CapcelPak C18 AQ 5 μ m 2.0mm \times 35mm
2. 還元カラム : SHISEIDO CQ ID 2.0mm \times 20mm
3. 分離カラム : CapcelPak C18 AQ 3 μ m 2.0 \times 150mm

各カラムの使用目的は、濃縮カラムは試料中分析目的成分の濃縮と親水性夾雑物質除去のため、還元カラムはユビデカレノン (CoQ10) をユビデカレノールへ還元させることに

より電気化学検出器 (ECD) でトコフェロール、リコペンあるいは β -カロテンといったOH

基を有する脂溶性ビタミンおよび脂溶性フードファクターとの一斉分析に便利であるため、分離カラムは各成分を純化精製し単一成分として検出するためである。

【0014】

(移動相)

カラム展開用溶媒として以下を用意した。

移動相1：メタノール950mlと蒸留水50mlに無水過塩素酸ナトリウム6.122gの割合で混合溶解させ、超音波減圧脱気した後使用する。

移動相2：メタノール950mlとイソプロパノール50mlに無水過塩素酸ナトリウム6.122gの割合で混合溶解させ、超音波減圧脱気した後使用する。

移動相1は、試料注入後に濃縮カラムに送液し、分析目的成分をカラムに保持させ、前処理では除去しきれない分析試料中に残存するタンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、有機酸、糖類および塩類等の親水性夾雑成分を除去し、さらに生体試料中に多量に含まれる分析目的成分ではないコレステロール、脂肪酸、リン脂質および中性脂質等の疎水性成分を有効に流去させる目的で使用される。移動相2は、試料注入時から濃縮カラムでの夾雑成分除去プロセス完了時まで分離カラムに通液させておき、除去プロセス完了後、直ちにカラムスイッチングにより濃縮カラムに逆流させることによって分析目的成分を一気に溶出させ、同時に分離カラムに分析目的成分を送り込み純化精製し、単一分画化させる目的で使用される。

【0015】

移動相1の調製にあたっては、メタノールに対する蒸留水混合割合を増やすと疎水性夾雑成分の除去に支障を生じ、混合割合を減らすと親水性夾雑成分の除去に支障を生ずることに注意を要す。なお、移動相2のメタノールに対するイソプロパノールの混合割合を95:5から90:10あるいは80:20と増やしても、濃縮カラムからの溶出、分離カラムでの成分分離に大きな影響はない。無水過塩素酸ナトリウム添加量は、調製後の濃度を50mMとするために6.122g使用しており、6gあるいは7gであってもかまわない。

【0016】

(分離方法)

試料注入開始後2分間の分離システム構成機器、移動相およびカラムの相互接続関係を図1に示した。移動相1, 2の送液には、それぞれ1台ずつのポンプ1, 2 (ポンプ3001: 資生堂)、計2台を使用した。流速は、分析開始から終了時まで、移動相1は200 μ l毎分の速さ、移動相2は流速400 μ l毎分とした。分析中を通し、移動相1, 2に気泡が発生しないよう、3経路型減圧脱気装置 (SSC3215: センシュウ科学) を通過させた移動相を通液させた。また、還元カラムと分離カラムは直列に接続し、カラムオープン (タイプ3004: 資生堂) 内で40℃恒温状態に維持した。六方バルブ1には、リンスバルブ (タイプ3034: 資生堂)、六方バルブ2には高圧切り替え六方バルブ (タイプ3011: 資生堂) をそれぞれ用いた。オートサンプラーはHTSオートサンプラー (資生堂) を用い、システム全体のプログラム設定制御管理および数値処理には、EZChrom (資生堂) を用いた。試料および標準品は20 μ lオートサンプラー (HTSオートサンプラー: 資生堂) を用いて注入した。流路切り替えはシステムコントローラー (EZChrom: 資生堂) を用いてプログラム設定し、自動運転させて分離分析を行った。即ち、試料注入開始後から2分間、バルブポジションAとなるようプログラム設定し、濃縮カラムへ移動相1を流速200 μ l毎分の速さで通液し、分析目的成分の濃縮精製を行った。この間、濃縮カラムより流れ出る移動相は試料中の夾雑物とともにドレインへ排出され、還元カラムおよび分離カラムへ導入しないよう分析システムは配管されている。試料注入からの2分間、還元カラムおよび分離カラムには移動相2を流速400 μ l毎分の速度で通液させた。

試料注入2分後から15分までの分離システム構成機器、移動相およびカラムの相互接続関係を図2に示した。即ち、分析開始2分後に、バルブポジションBに切替えが行われるようプログラム設定し、濃縮カラムへ試料注入時の反対側から移動相2を流速400 μ l毎分の速度で通液して分析目的成分を溶出させ、溶出された分析目的成分を還元カラムに通してCoQ10をユビキノールに還元させ、さらに濃縮カラムに導入させ分析目的成分の分離を

行ったのち、分離された各成分の検出定量を行った。なお、ユビキノール、CoQ10の溶出時間はそれぞれ約14分、約26分であり、本法のごとくユビキノールに変換してから検出することにより分析時間を短縮させた。また、試料注入2分後から15分間までの間、移動相1は流速 $200\mu\text{l}$ 毎分の速さで、いずれのカラムにも通液されることなく、オートサンプラーを経由させてドレインより廃液されるよう分析システムは配管されている。試料注入15分から17分は、試料を複数連続分析するため再平衡化を行うため、バルブポジションAに切り替わるようプログラム設定し、図1の分離システム構成機器、移動相およびカラムの相互接続関係に戻した。移動相1, 2の送液には、それぞれ1台ずつのポンプ1, 2（ポンプ3001：資生堂）、計2台を使用した。流速は、分析開始から終了時まで、移動相1は $200\mu\text{l}$ 毎分の速さ、移動相2は流速 $400\mu\text{l}$ 毎分とした。分析中を通し、移動相1, 2に気泡が発生しないよう、3経路型減圧脱気装置（SSC3215：センシユー科学）を通過させた移動相を通液させた。

また、還元カラムと分離カラムは直列に接続し、カラムオープン（タイプ3004：資生堂）内で 40°C 恒温状態に維持した。六方バルブ1には、リンスバルブ（タイプ3034：資生堂）、六方バルブ2には高圧切り替え六方バルブ（タイプ3011：資生堂）をそれぞれ用いた。オートサンプラーはHTSオートサンプラー（資生堂）を用い、システム全体のプログラム設定制御管理および数値処理には、EZChrom（資生堂）を用いた。

【0017】

（検出方法）

ユビデカレノール、トコフェロール、リコペンおよび β -カロテンは 600mV で定量的に分析可能である。アンペロメトリー式電気化学検出器3005（資生堂）やパルス式電気化学検出器3016（資生堂）を用い、図1および図2に示したHPLC条件で、唾液中にカルボニル基を有するCoQ10とOH基を有するトコフェロール、リコペンおよび β -カロテンが混在するため、前述の市販のオンライン還元カラムを用いてCoQ10のカルボニル基をOH基へ還元してから酸化モード検出することにより図3、図4に示すように一括検出する。

ECD検出器は毎分析前に、Sensitivityを0.1にTime Constantを標準（Std.）に設定し、ベースラインの水準が 1nA 程度に維持できることを確認し使用した。UV検出器は試料中存在量が多いトコフェロール、コレステロール、中性脂質や脂肪酸の分析に便利である。設定すべき検出波長は、既知の波長で十分である。

【0018】

（検量線、感度および試料注入量）

アンペロメトリー式電気化学検出器3005（資生堂）やパルス式電気化学検出器3016（資生堂）を用いた場合、CoQ10、トコフェロール、ユビデカレノール、リコペンおよび β -カロテンは $1.56\sim 200\text{ng/ml}$ 含むように調整した混合標準品を $20\mu\text{l}$ 注入し、直線回帰可能な検量線を作成した。試料注入量は、オートサンプラーとしてHTSオートサンプラー（資生堂）を用いた場合、標準的には $20\mu\text{l}$ であるが、濃厚試料では $2\mu\text{l}$ 注入で、希薄試料では $50\mu\text{l}$ 注入にして分離定量することができる。感度は、前処理した試料の濃縮倍率を上げ、試料注入量を増やすことで所望するレベルに変えることができる。

【0019】

実施例1

耳下腺唾液試料A、BおよびCのクロマトグラムを図1に示し、リコペン、 β -カロテンおよびCoQ10のピークを見やすくするため図1の拡大図を図2に示した。唾液試料Aのクロマトグラムは、市販サプリメントであるコーキューリブロン（日清ファルマ）を毎朝晩7時に1日2回2錠、1ヶ月摂取しているヒトの耳下腺唾液を採取し、唾液 1ml に対しエタノール 3ml を加えて除タンパクした上清を $50\mu\text{l}$ 注入して得たものである。1錠中の含量は 10ml の蒸留水に1錠入れ 40°C で30分超音波をかけてゼラチンカプセルを溶解させた後、イソプロパノール 90ml を加えて除タンパクした上清 $20\mu\text{l}$ を注入して成分分析を行った。CoQ10として 24.1mg/1錠 、 α -トコフェロールとして 6.9mg/1錠 であり、リコペンおよび β -カロテンは検出されなかった。1日当たりのサプリメントからの摂取量は、Co

Q10として48.2mg、 α -トコフェロールとして13.8mgであった。一方、唾液試料Bのクロマトグラムは、自己申告により市販サプリメントを一切摂取していないことの確認されたヒトの耳下腺唾液1mlに対しエタノール3mlを加えて除タンパクした上清50 μ lで行った。さらに、耳下腺唾液試料Cのクロマトグラムは、自己申告により市販トマトジュースを毎日一缶(180ml入り)摂取していることの確認されたヒトに、銘柄を指定(デルモンテ社製 熟トマト 食塩無添加)して1週間摂取させた後に採取した耳下腺唾液1mlに対しエタノール3mlを加えて除タンパクした上清50 μ lを注入して得たものである。一缶中の成分分析を1mlのジュースにイソプロパノール9mlを加えて除タンパクした上清20 μ lを注入しておこなった、1缶中にはリコペン19.7mg、 β -カロテン2.7mgが含まれていた。

図1の耳下腺唾液試料AとBのクロマトグラム上のトコフェロールとCoQ10のクロマトグラムを比較すると、サプリメントからの摂取者Aの方が大きい。また図2の耳下腺唾液試料Bと唾液試料Cのクロマトグラムを比較すると明らかにトマトジュース常用者リコペンおよび β -カロテンのピークが大きい。従って、摂取量の多いヒトでは耳下腺唾液中の濃度も高いと考えられ、検体として耳下腺唾液を用いて脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターを分析することにより摂取された健康補助食品、薬剤または食物に含まれる脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターの生体内移行の程度を判定を行えると考えられた。

【0020】

実施例 2

社内ボランティア11名に市販CoQ10サプリメントを1週間連続して毎朝9時に2錠(CoQ10の2錠中含量100mg)経口摂取させ、検体として、CoQ10摂取前及び1週間経口摂取後の午後4時にヘパリン加血漿と唾液を採取した。唾液の採取は、水で口をすすいだ後、5分間椅子に座り安静にしこの間に口腔内に溜まった唾液を吐き捨てて、口腔内の初期化を行ってから実施した。直接採取唾液は、口腔内に溜まった唾液を直接採取唾液として約1ml採取した。耳下腺採取唾液は、舌下に脱脂綿2gを咥えさせ、舌下腺・顎下腺の唾液混入の起こらないようにして、コットン製の唾液吸収体と色変化で採取終了を知らせるインジケータからなるSaliva Samplerを耳下腺開口部の近くである歯列と頬の間に挟みこませ、椅子に座らせ安静静粛状況にて採取した。Saliva Samplerを用いたときに採取された唾液量の11人での平均は1ml、変動幅は0.9~1.1mlと良好な再現性を示した。耳下腺採取唾液中CoQ10分析は、唾液を吸収させたSaliva Samplerを専用チューブに移し、これに4mlのエタノールを加え、終濃度75%とし、10分間転倒混和を行い吸収体からの抽出とタンパクの凝固を行った後、吸収体の断片と不要なタンパクを4℃1000Gにて遠心分離して除去した上清20 μ lをHPLCに供した。なお、耳下腺唾液採取の際に、舌下に脱脂綿2gを咥えることは必須ではなく、舌下腺・顎下腺を嚥下により飲み込むことで、混入を回避することができる。直接採取唾液の前処理は、250 μ lの試料エタノール750 μ lを加えて混合し、4℃、1000G 5分間遠心分離により除タンパクを行い、上清20 μ lをHPLCに供した。血漿の前処理は、血漿20 μ lにエタノール180 μ lを加えて混合し、不要なタンパクを4℃1000Gにて遠心分離して除去した上清20 μ lをHPLCに供した。

【0021】

実施例 3 (血中値と唾液含有量の相関性の実験)

耳下腺唾液中のCoQ10について、CoQ10の摂取前と摂取後について11人の被験者で血液中の総CoQ10値と相関性があることを確認した。CoQ10は、100mg/日で毎朝9時に1週間経口摂取させた。CoQ10の分析は、摂取開始前及び摂取1週間後に行った。その結果、図5及び図6に示すように有意の相関性が確認できた。これにより、耳下腺唾液中の数値を分析すれば、栄養補助食品等の生体内移行量を検定できることが確認された。

【0022】

実施例 4 (唾液の耳下腺唾液と舌下唾液での分析)

耳下腺唾液中のCoQ10と舌下唾液を多量に含む直接採取した唾液について、CoQ10の摂取前と摂取後について11人の被験者で血液中の総CoQ10値との相関性について検討した。CoQ10は、100mg/日で1週間経口摂取させた。CoQ10の分析は、摂取開始前及び摂取1週間後に

行った。その結果、耳下腺唾液中のCoQ10は、図1及び図2に示すように有意の相関性が確認できたが、直接採取唾液中のCoQ10は、図3及び図4に示すように有意の相関性が確認できなかった。これにより、特に耳下腺唾液中の数値を分析すれば、栄養補助食品等の生体内移行量を検定できることが確認された。

【0023】

実施例5（耳下腺唾液の吸収体素材と抽出の必要性）

実施例2の検体調製法において唾液の吸収体の素材について比較検討を行った。吸収体50mgを唾液600 μ lに浸漬し、吸収体の隙間に保持された唾液中のCoQ10濃度を分析するため20 μ lを分取し、これにイソプロパノール180 μ lを加えて混合し、4℃、1000G 5分間遠心分離により除タンパクを行い、上清20 μ lをHPLCに供した。CoQ10分析結果を「吸収体50mgを唾液600 μ lに浸漬し、吸収体の隙間に保持された唾液中のCoQ10濃度」として表1に示す。耳下腺唾液の分泌は1mlの分泌に要する時間は短い人で3分間ほど、長いヒトでは10分以上要したため、吸収体を用いることなく採取することは実施上困難である。この際、用いる唾液吸収体の素材、ポリエステル、コットンおよびアセチルセルロースの何れにたいしても脂溶性フードファクターや脂溶性ビタミンの吸着は起こる。また低吸着性のポリウレタンであっても唾液中の水分を結合水として補足してしまうため濃縮が起こり、見かけ上高い値を示す（表1参照）。従って、吸着した成分を抽出させることが必要となる。また、例えば、2mlの唾液と接触したにコットン製の吸収体が、隙間に1mlの水相を含んでいたとしても、抽出を行うと唾液1mlと接触したときよりも高値結果を与えることとなることが明らかとなった。このことは、口腔内で一定量の吸収体に一定量の唾液を吸収させなければならぬことを意味する。従って、耳下腺採取唾液の採取は、Saliva Samplerを用い、吸収体の毛細管現象を利用し、一度吸収された唾液面の吸収体からの漏れ出しの起こらないようにして採取を行い、インジケータの色の変化で正確に1mlの唾液を吸収させて行うこととした。

【表1】

処理条件	CoQ10(ng/ml)	回収率(%)
唾液（コントロール）	33.7	100
コットン	3.4	10.2
ポリエステル	19.6	58.2
ポリウレタン	59.8	178
アセチルセルロース	2.5	7.3

【0024】

実施例6

（除タンパク質溶媒の違いによる抽出効果の確認）

実施例1及び2の検体調製法において、溶媒をエタノール（90，75，50％）、イソプロパノール（90，75，50％）、又はメタノール（90，75，50％）を使って比較検討した。50mgの吸収体に唾液600 μ lと各溶媒を600，1800および5400 μ l加え、各々終濃度50，75および90％（V/V）として混合攪拌した後、4℃、1000Gで遠心分離した上清20 μ lを用いHPLCにてCoQ10の分析を行った。その結果、以下の表2「3種類の溶媒、3濃度レベルで唾液を除タンパクして得られた上清中のCoQ10濃度（ng/ml）」の数値を得た。75％濃度でもタンパク質への吸着による影響がみられない抽出効率の良いエタノールが最適と考えられた。

【表 2】

除タンパクに用いた 溶媒濃度(V/V%)	除タンパクに使用した溶媒の種類		
	インプロパノール	エタノール	メタノール
90	56	98	61
75	19	86	2
50	23	3	2

【0025】

実施例 7

(唾液吸収体素材の材質の違いによらずエタノールで分析目的成分が抽出されることの確認)

実施例 2 の検体調製法において唾液の吸収体の素材と 75% (V/V) エタノールでの抽出回収率について比較検討を行った。吸収体 50mg を唾液 600 μ l に浸漬した後、エタノール 1800 μ l を加えて混合し、4℃、1000 G にて 5 分間の遠心分離により除タンパク質を行い、上清 20 μ l を HPLC に供した。CoQ10 分析結果を表 3 「吸収体 50mg を唾液 600 μ l に浸漬した後、エタノール 1800 μ l (終濃度 75%) で抽出したときの唾液中の CoQ10 濃度」に示す。濃度 75% (V/V) で抽出したときの唾液中の CoQ10 濃度は、唾液吸収体の素材によらず、75% (V/V) でほぼ 100% 回収できることを確認した。これより、唾液中の脂溶性成分の吸収体への吸着を起こしても、隙間に保持されている水相中の脂溶性成分含量の低下が起きても、吸収体と隙間に保持された水相に含まれる脂溶性フードファクターや脂溶性ビタミンの総和を分析することにより、耳下腺採取唾液 1ml 中の含量を求めることが可能となる。総量を求めるためには、吸収体に吸着された唾液量にエタノールを加え、終濃度 75% (V/V) とすることで吸収体の材質によらず正しく回収できることが明らかとなった。

【表 3】

処理条件	CoQ10(ng/ml)	回収率(%)
唾液(コントロール)	33.7	100
コットン+エタノール	32.2	95.6
ポリエステル+エタノール	34.2	102
ポリウレタン+エタノール	32.1	95.2
アセチルセルロース+エタノール	31.8	94.3

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図 1】 試料注入より濃縮時までの分離システム構成機器、移動相およびカラムの相互接続関係を示す。

【図 2】 濃縮カラムからの溶出時より分離精製時までの分離システム構成機器、移動相およびカラムの相互接続関係を示す。

【図 3】 サプリメント摂取者(唾液試料 A)、非摂取者(唾液試料 B) およびトマトジュースの日常的愛飲者(唾液試料 C) の試料のクロマトグラムを示す。

【図 4】 図 3 の拡大によりリコペンおよび β -カロテンのピークを拡大図として示す。

【図 5】 CoQ10 摂取前の血漿と唾液中の CoQ10 の測定値相関性を示す。

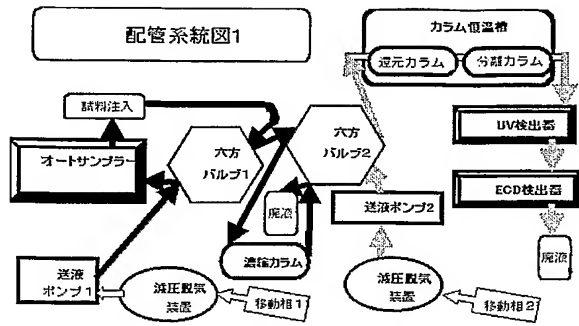
【図 6】 CoQ10 摂取後の血漿と唾液中の CoQ10 の測定値相関性を示す。

【図 7】 CoQ10 摂取前の血漿と直接採取唾液中の CoQ10 の測定値相関性のないことを示す。

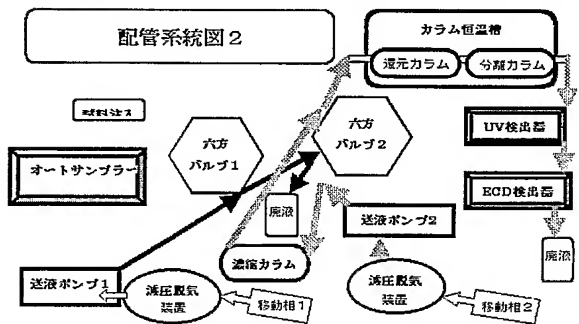
【図 8】 CoQ10 摂取後の血漿と直接採取唾液中の CoQ10 の測定値相関性のないことを示す。

【書類名】 図面

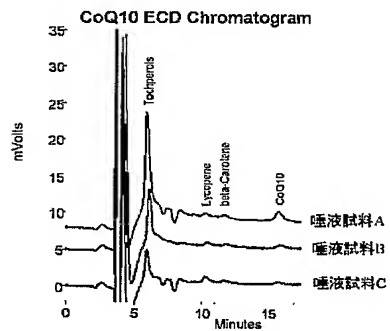
【図 1】



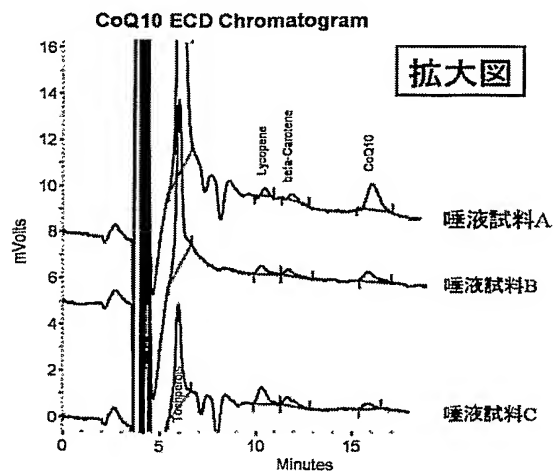
【図 2】



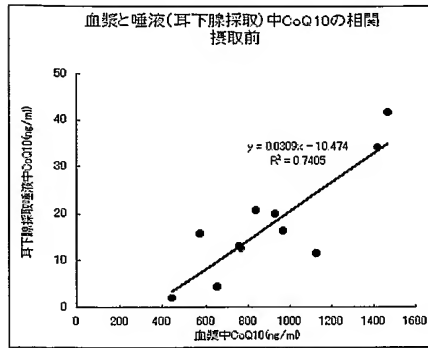
【図 3】



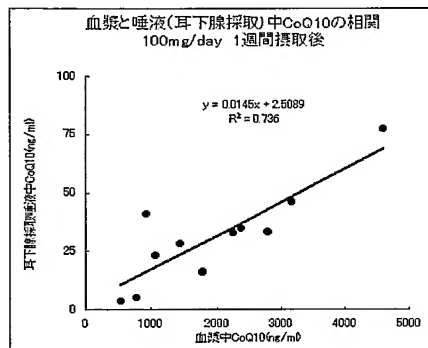
【図 4】



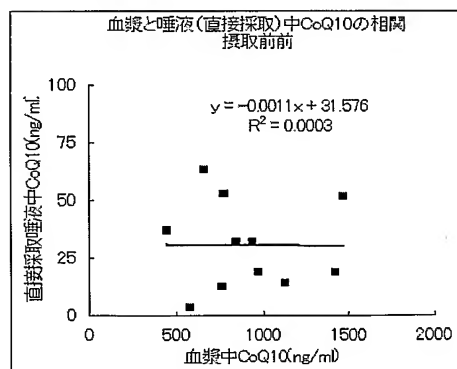
【図 5】



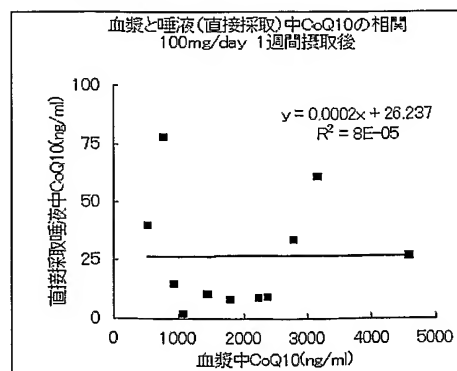
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

薬剤もしくは健康補助食品の摂取における生体内移行の測定方法に関する簡易な手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

薬剤もしくは健康補助食品の摂取における生体内移行の測定方法のためには、検体を選択すること、唾液採取具に吸着するため一定量の唾液と接触させて採取すること、および唾液採取具から測定目的成分を効率的に抽出するための溶媒としを選択することにより解決出来ることを見出し本発明を完成した。特に唾液中の測定対象物の濃度レベルが血中の1/10程度で、確実にフォローできることを見出し本発明を完成した。つまり、検体として唾液を用いて脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを測定することを特徴とする薬剤もしくは健康補助食品の摂取における生体内移行の測定方法、唾液採取具の性状および唾液採取具からの抽出法方法を提供した。

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2 0 0 4 - 3 0 9 7 0 2

受付番号

5 0 4 0 1 8 1 7 2 7 8

書類名

特許願

担当官

小松 清

1 9 0 5

作成日

平成 1 7 年 1 月 1 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】

平成 16 年 10 月 25 日

特願 2004-309702

出願人履歴情報

識別番号

[591122956]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所

氏名

1994年10月20日

名称変更

東京都板橋区志村3-30-1

株式会社三菱化学ビーシーエル